UNIVERSITE D'ALGER
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE D'ALGER
ANNÉE 1940 — N° 62

Contribution à l'Étude de l'Acétonurie Physiologique

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

THÈSE

pour le Doctorat en Médecine

présentée et soutenue publiquement le 21 Octobre 1940

par

VIOLET PIERRE
Né le 3 Avril 1908 à Alger

JURY

MM. GIBERTON, *Professeur de Chimie biologique et médicale* ..... Président

CABANES, *Professeur de Clinique gynécologique*
SARROUY, *Agrégé* (Médecine)..... } Juges
ETTORI, *Agrégé* (Chimie médicale) .....

Imprimerie Contemporaine, 49, Rue Michelet, Alger

UNIVERSITE D'ALGER
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE D'ALGER
ANNÉE 1940 — N° 62

Contribution à l'Étude de l'Acétonurie Physiologique

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

THÈSE

pour le Doctorat en Médecine

présentée et soutenue publiquement le 21 Octobre 1940

par

VIOLET PIERRE

Né le 3 Avril 1908 à Alger

JURY

MM. GIBERTON, *Professeur de Chimie biologique et médicale* ..... Président

CABANES, *Professeur de Clinique gynécologique*

SARROUY, *Agrégé* (Médecine) ..... Juges

ETTORI, *Agrégé* (Chimie médicale) .....

Imprimerie Contemporaine, 49, Rue Michelet, Alger

UNIVERSITÉ D'ALGER

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Doyen	MM. GILLOT (I. ✪).
Doyen honoraire	LEBLANC (✲, ⚕, I. ✪).
Assesseur	COSTANTINI (O. ✲, ⚕, I. ✪).

PROFESSEURS

Clinique médicale	MM. AUBRY (O. ✲, ⚕, I. ✪).
Hygiène, hydrologie et climatologie	BENHAMOU (O. ✲, ⚕, I. ✪).
Histologie et Embryologie	BENOIT (I. ✪).
Clinique gynécologique	CABANES (✲, ⚕, I. ✪).
Clinique chirurgicale	COSTANTINI (O. ✲, ⚕, I. ✪).
Botanique et matière médicale	FOURMENT (I. ✪, ❁, O. ✲).
Chimie biologique et médicale	GIBERTON (✲, A. ✪).
Clinique médicale et hygiène infantile	GILLOT (I. ✪).
Clinique obstétricale et puériculture du premier âge	LAFFONT (O. ✲. ⚕, I. ✪).
Clinique thérapeutique médicale	LEBON (O. ✲, ⚕, I. ✪).
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	LOMBARD (✲, ⚕, I. ✪).
Anatomie pathologique	MONTPELLIER (I. ✪).
Pharmacie	MUSSO (✲, I. ✪).
Bactériologie	PINOY (✲, I. ✪).
Clinique psychiâtrique	POROT (I. ✪).
Physique médicale	PORTES (✲, ⚕, I. ✪).
Clinique de maladies des pays chauds, des maladies syphilitiques et cutanées	RAYNAUD (✲, ⚕, I. ✪).
Parasitologie et zoologie médicale	SENEVET (✲, ⚕, I. ✪).
Clinique ophtalmologique	TOULANT (✲, ⚕, I. ✪).
Physiologie	TOURNADE (O. ✲, ⚕, I. ✪).
Chimie générale pharmaceutique et toxicologie	WUNSCHENDORFF (I. ✪).
Anatomie	N...
Médecine légale	N...

PROFESSEURS HONORAIRES

M. ARGAUD (✲, ⚕, I. ✪).
M. COURRIER (✲, ⚕, I. ✪).
M. WEBER (✲, ⚕, I. ✪).
LEBLANC (✲, ⚕, I. ✪).

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. HOUEL (✲, ⚕, I. ✪), agrégé pérennisé (chargé de l'enseignement des élèves sages-femmes).

M. de RIBET (✲, ⚕, I. ✪), agrégé pérennisé (Anatomie).

CHARGES DE COURS

Clinique d'oto-rhino-laryngologie . . . M. H. ABOULKER (✲, ⚕, I. ✪).

AGREGE LIBRE CHARGE D'UN COURS SANS LIMITE DE TEMPS

Chirurgie . . . M. FERRARI (✲, I. ✪).

AGREGES

Accouchements	MM. JAHIER.
Médecine	LACROIX (A. ✪).
	THIODET (⚕).
	SARROUY (✲, ⚕).
Histologie	KEHL.
Chirurgie	SABADINI (A. ✪).
	GOINARD.
	CURTILLET.
Anatomie pathologique	N...
Anatomie	N...
Chimie médicale	ETTORI (A. ✪).
Histoire naturelle pharmaceutique	ROQUES (A. ✪).
Physiologie	N...
Pharmacie	MONNET.

AGREGES LIBRES

Physiologie	MM. BATTEZ.
Chirurgie	DUBOUCHER (I. ✪).

NOTA. — La Faculté n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et selon la tradition d'Hippocrate, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent, et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Je dédie cette Thèse :

A TOUS LES MIENS

A MON MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR GIBERTON

Professeur de Chimie biologique et médicale

Depuis que vous m'avez accueilli dans votre Laboratoire, vous m'avez toujours témoigné un très grand intérêt. Vos conseils éclairés ont été pour moi un bien précieux.

De tout ce que vous avez fait pour moi, je vous suis profondément reconnaissant.

A MES JUGES

Monsieur le Professeur CABANES

Professeur de Clinique gynécologique

Nous n'oublierons pas le savant enseignement si vivant et si profondément humain que vous nous avez dispensé à la Clinique gynécologique.

Nous vous sommes reconnaissant de l'honneur que vous nous faites en acceptant d'être notre Juge, et nous vous prions d'agréer l'hommage de notre respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur agrégé SARROUY

Professeur agrégé de Médecine

Vos belles leçons à la Clinique médicale infantile se sont gravées dans notre mémoire.

Nous vous remercions d'avoir bien voulu siéger parmi nos Juges, et nous vous prions d'accepter l'expression de nos sentiments respectueux et reconnaissants.

Monsieur le Professeur agrégé ETTORI

Professeur agrégé de Chimie médicale

La sollicitude avec laquelle vous nous avez aidé dans l'élaboration de ce travail nous a profondément touché.

Veuillez trouver ici un bien faible témoignage de mon affectueuse gratitude.

A MES MAITRES

DE LA FACULTE ET DES HOPITAUX

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE
L'ACÉTONURIE PHYSIOLOGIQUE

POSITION DU PROBLÈME ET PLAN DU TRAVAIL

Il est actuellement démontré que l'urine de sujets normaux renferme de façon constante de petites quantités de corps cétoniques : (acide β-hydroxybutyrique, acide acétylacétique, acétone). Quel est l'ordre de grandeur de cette acétonurie physiologique, quelle est sa signification? Le présent travail est une contribution à la solution de ces deux questions.

Comme on peut le concevoir à priori, le choix de la méthode de dosage employée a une importance décisive dans la détermination de cette excrétion. Le taux très faible d'élimination impose une méthode essentiellement sensible et spécifique.

Nous serons ainsi amenés à discuter, dans une première partie, les méthodes de dosage de l'acétone de ce double point de vue. Ayant adopté une méthode satisfaisant à ces conditions, nous l'utiliserons pour une étude statistique de l'acétonurie physiologique de l'homme sain, essayant de voir si l'habitant de nos régions, jamais étudié encore à ce point de vue, diffère de ceux des contrées où des recherches de ce genre ont déjà été faites; ce sera la deuxième partie de notre travail.

Enfin, dans une troisième partie, nous essaierons d'expliquer comment les conceptions actuelles du métabolisme intermédiaire rendent compte de cette acétonurie physiologique. De nouvelles notions se sont, en effet, introduites ces dernières années, touchant à la fois au métabolisme des lipides et au métabolisme des glucides. L'interprétation de l'acétonurie physiologique n'est peut-être plus aussi simple qu'à l'époque où la théorie de la β-oxydation régnait seule.

Telles sont les questions que nous nous sommes posées, et tel est le plan d'étude que nous avons adopté pour ce travail sur l'acétonurie physiologique.

PREMIÈRE PARTIE

PARTIE TECHNIQUE

LES MÉTHODES DE DOSAGE DES CORPS CÉTONIQUES DE L'URINE

Nous nous garderons de passer ici en revue toutes les méthodes qui ont été proposées pour le dosage des corps cétoniques urinaires, depuis que la présence de ces corps fut reconnue dans les urines des sujets atteints de diabète.

C'est qu'en effet, il ne saurait être question même de songer à appliquer à des taux aussi faibles que ceux qui nous occupent, de vieilles méthodes imprécises comme la polarimétrie de l'acide β-hydroxybutyrique selon BERGELL [1], ou son dosage par transformation en acide crotonique selon DARMSTÆDTER [2].

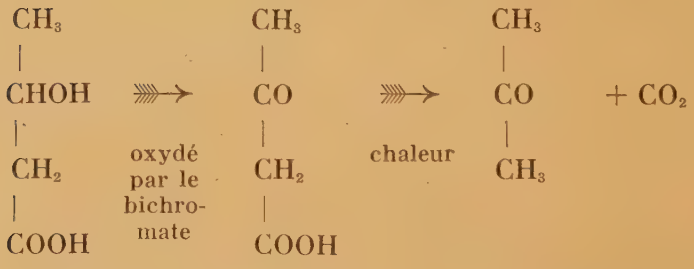
On peut dire que les premières méthodes de dosage applicables dans une telle étude datent surtout des travaux de l'école américaine. C'est par ces méthodes seulement, que l'on peut atteindre de façon précise les divers représentants de la triade cétonique.

Nous allons donner un exposé succinct de ces méthodes, insistant surtout sur les principes qui ont guidé leurs auteurs, et essayer d'en évaluer les qualités en fonction de notre problème de l'acétonurie physiologique .

PRINCIPES GÉNÉRAUX DES MÉTHODES DE DOSAGE DES CORPS CÉTONIQUES

Les systèmes cohérents de dosage des divers corps cétoniques qui ont été proposés dans les trente dernières années, reposent sur des principes qui ne sont, certes, pas nouveaux, étant issus des propriétés chimiques de corps connus depuis fort longtemps des organiciens.

Il n'est peut-être pas inutile de rappeler ici les formules de constitution, qui permettent la compréhension du comportement des corps cétoniques vis-à-vis des divers réactifs. Sous les flèches qui symbolisent le passage de l'un à l'autre, nous avons indiqué l'agent le plus communément utilisé pour sa réalisation en chimie analytique.



Acide β-oxybutyrique (ou Hydroxy)

Acide acétylacétique

Acétone

On peut ramener à quatre les réactions utilisées dans les méthodes de dosage que nous allons examiner.

1° *Réaction de l'iodoforme.* — L'acétone réagit sur l'iode en solution alcaline, avec formation d'iodoforme, selon le schéma suivant :

$$CH_3 - CO - CH_3 + 3\,I_2 + 4\,NaOH = CHI_3 + CH_3COONa + 3\,NaI + 3\,H_2O$$

D'où une méthode de dosage iodométrique, l'excès d'iode non transformé en iodoforme étant titré par l'hyposulfite de soude. Une molécule d'acétone réagissant sur trois molécules d'iode, le dosage sera possible pour de faibles teneurs en acétone.

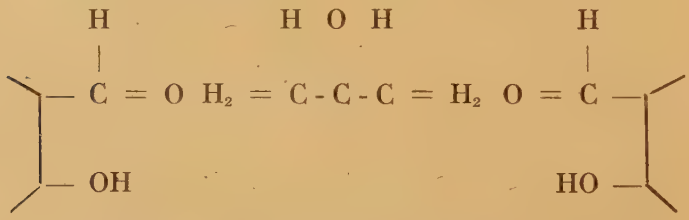
2° *Précipitation de l'acétone par le cyanure de mercure.* — Cette réaction a été découverte par Marsh & Struthers [3] : l'acétone précipite quantitativement par le cyanure de mercure en milieu alcalin.

Ce précipité, très insoluble, se redissout dans l'acide nitrique, et le mercure peut être titré par le sulfocyanure.

3° *Précipitation de l'acétone par le sulfate mercurique.* — Deniges [4] a montré qu'à l'ébullition, l'acétone se combine au sulfate mercurique en solution sulfurique pour former un précipité cristallin, dont le poids est égal à 20 fois le poids d'acétone combinée. Nous verrons, lors de l'application au dosage, les formules de ce complexe données par les auteurs qui ont étudié cette réaction. L'acétone

peut être déterminée, soit par pesée du précipité, soit par dosage du mercure après dissolution du précipité.

4° *Réaction colorée avec l'aldéhyde salicylique en milieu alcalin.* — Fabinyi [5], en 1900, a montré qu'en chauffant, en présence d'alcali, de l'acétone avec de l'aldéhyde salicylique, on obtient un corps coloré en rouge : le di-hydroxy-benzal-acétone.



Frommer a appliqué cette réaction à la recherche qualitative de l'acétone dans l'urine, et il a pu déceler l'acétone à une dilution de 0,01 mg. par centimètre cube.

Les quatre réactions-type utilisées pour le dosage des « corps cétoniques » sont, comme nous venons de le voir, des réactions de l'acétone elle-même. En effet, l'acide β-hydroxybutyrique et l'acide acétylacétique qui, dans les liquides biologiques, se rencontrent à côté de petites quantités d'acétone préformée, sont ,pour le dosage, transformés en acétone.

On dose généralement, d'une part : le bloc acétone préformée + acide acétylacétique (ce dernier se transformant spontanément en acétone à la température de l'ébullition) ; et, d'autre part, l'acide β-hydroxybutyrique. Les résultats sont le plus sou-

vent exprimés en acétone. Cependant, l'écriture la plus correcte serait la notation en millimolécules.

Nous allons maintenant décrire les diverses méthodes de dosage avant de les analyser.

MÉTHODES VOLUMÉTRIQUES

DOSAGE DU BLOC ACÉTONE PRÉFORMÉE + ACIDE ACÉTYLACÉTIQUE

Méthode de GUILLAUMIN

GUILLAUMIN [6], s'inspirant des travaux de SHAFFER, MARIOTT, MESSINGER, VORTMANN, HUPPERT, et surtout HUBBARD, a élaboré pour l'urine une méthode iodométrique de dosage du bloc « acétone préformée + acide acétylacétique ».

Principe de la méthode.

L'urine, préalablement déféquée et filtrée [1], est distillée après addition d'acide phosphorique. Ce premier distillat additionné de permanganate de potassium et d'acide sulfurique, est distillé à son tour. Le deuxième distillat, additionné de bioxyde de sodium, est distillé et fournit un liquide sur lequel on pratique le dosage.

1. Il n'est pas inutile de rappeler que la défécation de l'urine est indispensable, lorsque l'on a en vue le dosage de l'acide β-hydroxybutyrique mélangé à l'acétone et l'acide acétylacétique. Dans le cas où l'on négligerait l'acide β-hydroxybutyrique, la défécation doit également être effectuée, lorsque l'on a à doser des quantités aussi faibles que celles rencontrées dans l'acétonurie physiologique.

Pour cela, en présence de soude, on ajoute une quantité connue, et en excès, de liqueur titrée d'iode. L'acétone est ainsi transformée en iodoforme. On passe alors en milieu légèrement acide, et l'on dose à l'hyposulfite l'iode en excès.

Remarque. — La distillation effectuée en présence de permanganate en milieu acide a pour but d'oxyder les composés à fonction alcool.

La dernière distillation, pratiquée en présence de bioxyde de sodium oxyde les aldéhydes (préexistants ou formés au cours de l'oxydation permanganique), retient les acides (préexistants ou résultant de l'oxydation des aldéhydes), en même temps que les phénols de l'urine.

Appareillage et mode opératoire.

Voici l'appareillage et le mode opératoire proposés par Guillaumin :

Appareillage. — L'appareil distillatoire est constitué par un ballon de 500 cm^3 surmonté d'une Colonne de Vigreux de 20 à 25 cm. de long et placée verticalement. A cette colonne est relié, par un tube coudé deux fois à angle droit, un réfrigérant descendant, également vertical. On lui raccorde un tube de 7 à 10 mm. de diamètre, muni d'une boule de sûreté et terminé par une boule de Villiers. Cette boule de Villiers plonge dans 20 cm^3 d'eau distillée placés dans une éprouvette.

Défécation de l'urine.

Guillaumin préconise, pour la défécation, la mé-

thode de Van Slyke au sulfate de cuivre et à la chaux. Voici la méthode de Van Slyke [7] :

Dans un récipient jaugé de 250 cm³, on mesure dans l'ordre : 25 cm³ d'urine, 100 cm³ d'eau, 50 cm³ de solution cuprique (200 gr. de sulfate de cuivre cristallisé dissous dans *q. s.* d'eau pour faire un litre). On mélange et l'on ajoute 50 cm³ de lait de chaux (à 100 gr. par litre de chaux pure). On agite fortement le mélange, dont la teinte bleue fonce. On complète à 250 cm³, on homogénéise, puis on laisse reposer 30 minutes, et l'on filtre sur filtre plissé [1].

Remarque. — Le filtrat doit être limpide. On doit, de plus, s'assurer qu'il est exempt de sucre. Lorsque les urines contiennent plus de 8 p. 100 de glucose, on abaisse la prise d'essai à 20 ou même 15 centimètres cubes.

Dosage proprement dit.

1^er^ temps : *Distillation.* — Le volume de la prise d'essai du filtrat précédent est fixé par l'intensité de la réaction de Legal, préalablement effectuée sur l'urine.

Lorsque la réaction est très intense (anneau violet foncé occupant rapidement toute la couche d'ammoniaque, ce qui correspond à une teneur en acétone comprise entre 0,5 et 3 p. 100), la prise d'essai

---

1. Hubbard [8] a proposé pour la défécation une technique un peu différente. Cet auteur utilise comme réactif du sulfate de cuivre et de l'acétate de plomb en milieu sodique.

sera de 5 à 20 cm^3. Lorsque la réaction, sans être intense, est encore très nette (ce qui correspond à une teneur en acétone comprise entre 0,1 et 0,5 p. 100), la prise d'essai est de 25 cm^3. Lorsque la réaction est à peine positive (concentration en acétone inférieure à 0,1 p. 100), la prise d'essai sera de 50 cm^3. Enfin, si la teneur en acétone est inférieure à la limite de sensibilité de la réaction de Legal, la prise d'essai sera de 100 cm^3.

La prise d'essai est placée dans le ballon de l'appareil distillatoire. On ajoute de l'eau distillée, de manière à avoir un volume de 100 cm^3, puis on verse 1 cm^3 d'acide phosphorique et un fragment de paraffine pour éviter la mousse durant la distillation. Celle-ci doit être conduite de façon à maintenir une franche ébullition, et de telle sorte que l'on obtienne en dix minutes de 30 à 40 cm^3 de distillat. Le résidu de la distillation est recueilli quantitativement et conservé pour y doser ultérieurement l'acide β-hydroxybutyrique.

Le distillat et les eaux de lavage de l'éprouvette sont amenés à 100 cm^3 et versés dans le ballon, préalablement rincé ; on ajoute 10 cm^3 de permanganate de potassium à 1 p. 100, et 10 cm^3 d'acide sulfurique à 1 p. 5 en volume, et l'on distille à nouveau pendant 10 minutes. Le deuxième distillat est amené à 100 cm^3 avec les eaux de lavage; on le verse dans le ballon distillatoire rincé au préalable; on y ajoute 0,5 gr. de bioxyde de sodium et 5 cm^3 de soude à 10 p. 100. On distille, en recueillant, cette fois, 50 à 60 cm^3 de distillat.

2e temps : *Iodométrie.* — A la totalité de ce distillat, que l'on a pris soin de recueillir dans une fiole bouchant à l'émeri, on ajoute 25 cm³ d'iode N/10 et 10 cm³ de soude pure à 10 p. 100. On bouche la fiole, on l'agite vivement, et l'on abandonne au repos pendant 10 minutes. Après ce délai, on ajoute une quantité d'acide sulfurique au cinquième, suffisante pour neutraliser la soude et donner au milieu une réaction légèrement acide. La quantité d'acide sulfurique à employer est fixée par un essai préalable sur la soude à 10 p. 100. Cette quantité est, en général, de 3 à 5 cm³ d'acide sulfurique pour 10 cm³ de solution de soude utilisés.

On dose l'excès d'iode en présence d'empois d'amidon, au moyen d'une solution d'hyposulfite de soude N/10. 1 cm³ de liqueur d'iode N/10 correspond à 0,968 mg. d'acétone; soit n le nombre de centimètres cubes de la solution d'hyposulfite de soude employés, la quantité d'acétone contenue dans la prise d'essai est en milligrammes.

$$(25 - n) \times 0{,}968$$

DOSAGE DE L'ACIDE β-HYDROXYBUTYRIQUE

Technique de HUBBARD

L'urine, étant déféquée selon le procédé préconisé par cet auteur, est filtrée. On verse 150 cm³ de ce filtrat dans un ballon de 300 cm³. On ajoute 10 centimètres cubes d'acide sulfurique à 50 p. 100, et l'on relie le ballon à l'appareil à distiller (qui est le même que celui qui sert à doser le bloc acétone préformée + acide acétylacétique, et l'on distille 10 minutes à une allure telle que l'on ait obtenu environ 50 cm³ de distillat au bout de ce temps.

L'acétone préformée et l'acide acétylacétique étant ainsi chassés, on remplace l'éprouvette où l'on a recueilli le distillat, par une autre contenant 20 centimètres cubes d'eau. On amène à nouveau le liquide contenu dans le ballon à la température de l'ébullition, et l'on fait arriver par un entonnoir à robinet 20 cm³ d'acide sulfurique à 50 p. 100 et 30 cm³ de solution de bichromate de potassium à 0,2 p. 100. Après 10 minutes d'ébullition, on ajoute 50 cm³ de solution de bichromate. Dix minutes plus tard, on verse encore 50 cm³ de cette solution, et l'on prolonge l'ébullition encore 10 minutes. On maintient pendant toute l'opération une ébullition telle que l'on obtienne environ 5 cm³ de distillat par minute. Le distillat est alors redistillé en présence de permanganate acide, puis une autre fois en présence de péroxyde de sodium en milieu alca-

lin comme pour l'acétone et l'acide acétylacétique. Le dosage par iodométrie donnera la quantité d'acétone provenant de l'oxydation de l'acide β-hydroxybutyrique contenu dans la prise.

DOSAGE DES CORPS CÉTONIQUES PAR LE RÉACTIF DE DENIGÈS

Méthode de VAN SLYKE

Les conditions définies par VAN SLYKE pour précipiter l'acétone en combinaison mercurielle sont un peu différentes de celles décrites par DENIGÈS.

Ainsi, tandis que le complexe obtenu par DENIGÈS a une constitution répondant à la formule :

$$(2\,S\,O^4\,Hg,\ 3\,Hg\,O)^4\ .\ 5\,C^3\,H^6\,O$$

ce qui correspond à un pourcentage en acétone de 5,52, celui obtenu par VAN SLYKE répond à la formule :

$$3\,S\,O^4\,Hg\,,\ 5\,Hg\,O\ .\ 2\,C^3\,H^6\,O$$

ce qui correspond à un pourcentage en acétone de 5,50. Chacun des précipités, lorsque les conditions définies par les auteurs sont respectées, a une composition rigoureusement constante.

Il est à remarquer que, la précipitation s'effectuant à la température de l'ébullition, on précipite en même temps l'acétone préformée et celle résultant de la décarboxylation de l'acide acétylacétique.

Voici quelle est la technique de Van Slyke : La méthode de Van Slyke comporte deux variantes, l'une, gravimétrique, se termine par la pesée du précipité mercuriel ; l'autre, volumétrique, se termine par le dosage du mercure inclus dans le complexe après que celui-ci a été dissous.

Défécation.

Le procédé de Van Slyke est celui au sulfate de cuivre et à la chaux que nous avons précédemment exposé en décrivant la méthode iodométrique de Guillaumin. Par la méthode de Van Slyke, nous pouvons doser : soit le bloc acétone préformée + acide acétylacétique, soit l'acétone provenant de l'oxydation de l'acide β-hydroxybutyrique; ou bien doser simultanément, en une seule opération, les corps cétoniques totaux.

Dosage du bloc acétone + acide acétylacétique.

L'acide acétylacétique est décomposé à l'ébullition en CO_2 et en acétone; celle-ci et l'acétone préformée sont précipitées en même temps par le sulfate mercurique.

On verse 25 cm³ du filtrat de l'urine déféquée dans un Erlenmeyer en pyrex de 500 cm³, on y ajoute 100 cm³ d'eau, 10 cm³ d'acide sulfurique à 50 p. 100, et 35 cm³ de la solution de sulfate mercurique à 10 p. 100 [1]. On adapte un réfrigérant à

1. L'auteur recommande, pour la préparation de ce réactif, le procédé suivant : 73 gr. d'oxyde de mercure rouge sont dissous dans 1 litre d'acide sulfurique de concentration 4 N.

reflux dont le tube a un diamètre de 8 à 10 mm. On porte à l'ébullition. On maintient cette ébullition pendant 30 minutes, mais pas davantage : une ébullition de 45 minutes amènerait une décomposition partielle de l'acide β-hydroxybutyrique qui fausserait le résultat Le précipité peut être recueilli sur un creuset de Gooch ou sur un creuset en verre poreux d'Iéna, soit par filtration de la solution encore chaude, soit après refroidissement. Le précipité est lavé avec 200 cm^3 d'eau froide. Pour la détermination gravimétrique, le creuset contenant le précipité est séché pendant 1 heure à 110°, et ensuite refroidi à la température ambiante. (Plusieurs précipités peuvent ainsi être recueillis sur le même filtre, sans avoir à nettoyer le creuset.)

Dosage simultané des corps cétoniques totaux.

On procède de la même manière et avec les mêmes prises d'urine et de réactifs que ci-dessus; mais dès que l'ébullition a commencé, on ajoute par le réfrigérant 5 cm^3 de solution de bichromate de potassium à 5 p. 100. On maintient une ébullition lente pendant 1 heure environ.

Le précipité jaune qui se forme est un complexe de chromate, sulfate mercurique, et d'acétone. L'auteur remarque que la transformation de l'acide β-hydroxybutyrique en acétone n'est pas complète. Dans les conditions de l'expérience, 1 molécule d'acide β-hydroxybutyrique donne 0,75 molécule d'acétone. Si l'oxydation a lieu à froid, une grande partie de l'acide β-hydroxybutyrique est oxydée en

acide acétylacétique et non en acétone. C'est pour cette raison que le bichromate est ajouté seulement à l'ébullition.

Dosage de l'acide β-hydroxybutyrique.

L'acide β-hydroxybutyrique est déterminé de la même manière que les corps cétoniques totaux, mais après que l'acétone préformée et l'acétone provenant de la décarboxylation de l'acide acétylacétique aient été chassées par ébullition.

Pour cela, 25 cm^3 du filtrat de l'urine, 100 cm^3 d'eau et 2 cm^3 d'acide sulfurique à 50 p. 100 sont portés à l'ébullition pendant 10 minutes. Ensuite, le volume est complété à 127 cm^3 (pour remplacer l'eau évaporée) ; on ajoute alors 8 cm^3 d'acide sulfurique à 50 p. 100 et 35 cm^3 de la solution de sulfate mercurique, puis l'opération est conduite exactement comme pour le dosage des corps cétoniques totaux.

Quand il s'agit d'étudier des urines contenant de très petites quantités de corps cétoniques, comme les urines normales, Van Slyke recommande d'évaluer le précipité que donne le sulfate mercurique avec les constituants de l'urine autres que les corps cétoniques. Pour cela, 25 cm^3 du filtrat de l'urine déféquée sont portés à l'ébullition pendant 10 minutes en présence d'acide sulfurique, de manière à éliminer l'acétone. Ensuite, le résidu est traité par du sulfate mercurique dans les mêmes conditions que pour le dosage de l'acide β-hydroxybutyrique, mais, bien entendu, sans addition de bichro-

mate. Après une ébullition de 45 minutes, le précipité obtenu est recueilli, séché et pesé. Son poids, généralement de l'ordre de 1 à 9 mg., est retranché des résultats.

Variante volumétrique de la méthode de Van Slyke.

Le précipité est dissous dans l'acide chlorhydrique, et le mercure est titré par la méthode de Personne. Ce dosage est basé sur les deux réactions suivantes :

$$Hg\,Cl_2 + 2\,K\,I = Hg\,I_2 + 2\,K\,Cl$$

$$Hg\,I_2 + 2\,K\,I = K_2\,Hg\,I_4$$

Lorsqu'on verse une solution d'iodure de potassium dans une solution d'un sel mercurique, il se produit un précipité rouge d'iodure mercurique soluble dans un excès d'iodure de potassium.

Voici la technique donnée par Van Slyke : Lorsque l'on veut terminer le dosage par volumétrie, il est préférable, au lieu d'employer un creuset de Gooch, de recueillir le précipité sur un petit filtre de papier. Ce filtre, placé dans un Becher contenant 15 cm^3 d'acide chlorhydrique normal, est trituré au moyen d'un agitateur et chauffé jusqu'à dissolution du précipité. Après refroidissement, on ajoute de 6 à 7 cm^3 d'une solution d'acétate de sodium 3 M pour diminuer l'acidité de la solution. On verse dans la solution mercurielle une solution d'iodure de potassium 0,2 N, jusqu'à redissolution du précipité de biodure de mercure.

Si la quantité de mercure est très faible, de l'ordre de quelques milligrammes, l'excès d'iodure de

potassium aura pu être ajouté avant que l'iodure mercurique ait eu le temps de précipiter; dans ce cas, on utilise 5 cm^3 de solution 0,2 N d'iodure de potassium. L'excès d'iodure de potassium est titré par une solution de chlorure mercurique 0,05 M, jusqu'à obtention d'un précipité rouge de biodure de mercure.

ÉTUDE CRITIQUE DES MÉTHODES VOLUMÉTRIQUES ET PONDÉRALES

Les méthodes volumétriques et pondérales que nous venons d'étudier répondent-elles aux conditions de sensibilité et de spécificité exigées par l'étude du problème de l'acétonurie physiologique?

La méthode iodométrique est très sensible, 1 cm^3 de solution 0,001 N permettant de doser 0,01 mg. d'acétone; mais, en revanche, elle est peu spécifique et c'est justement ce défaut qui la rend très longue par les trois distillations successives nécessaires à l'élimination des substances perturbatrices.

La méthode pondérale est spécifique, la réaction s'effectue directement sur l'urine déféquée, sa sensibilité est suffisante : 1 mg. de précipité correspond à 0,05 mg. d'acétone. Mais les pesées ne conviennent pas aux dosages en série que réclame une étude statistique.

Nous allons voir, maintenant, si les méthodes basées sur la colorimétrie satisfont mieux aux conditions exigées par une étude systématique de l'acétonurie physiologique.

MÉTHODES COLORIMÉTRIQUES

Nous exposerons d'abord une méthode colorimétrique décrite par J.-A. Behre et S.-R. Benedict, puis une méthode donnée par Urbach, basée sur le même principe, mais différant sensiblement de la première par la composition du milieu dans lequel se passe la réaction et par la lecture photométrique terminale.

Méthode de J.-A. Behre et S.-R. Benedict [9]

Cette méthode adapte la réaction de l'aldéhyde salicylique à la détermination des petites quantités d'acétone que l'on trouve dans l'urine normale, et permet, selon les auteurs, de doser 0,005 mg. dans 5 cm^3 de distillat. L'acide β-hydroxybutyrique est oxydé, lors d'une seconde distillation, par le bichromate de potassium en milieu sulfurique, comme dans la méthode de Hubbard modifiée par Shaffer. On effectue préalablement une défécation par le sulfate de cuivre et l'hydroxyde de calcium, selon le procédé de Van Slyke, mais avec des concentrations modifiées. Nous exposerons la technique proposée par Behre, lorsque le dosage de l'acide β-hydroxybutyrique est également envisagé après la détermination du bloc acétone préformée et acétone provenant de l'acide acétylacétique. Dans ce cas, il faut éliminer le sucre et les autres substances perturbatrices avant toute distillation. Même si l'urine provient de sujets normaux, on prend cette précaution.

On peut distinguer trois temps dans la méthode :

Défécation ;

Distillation et dosage du bloc acétone + acide acétylacétique ;

Oxydation et dosage de l'acide β-hydroxybutyrique.

Défécation.

On verse dans un ballon 1 volume d'urine, 1 volume d'une solution de sulfate de cuivre à 40 p. 100, et suffisamment d'une suspension d'hydroxyde de calcium à 20 p. 100 pour rendre la réaction alcaline au tournesol (généralement 1 volume suffit). On complète à 5 volumes. Le mélange est agité vigoureusement, et on le laisse au repos pendant une demi-heure. Après filtration, on prend une partie du filtrat telle que la concentration en acétone de la prise soit d'environ 0,1 mg. Il faut, pour cela, de 2 à 50 cm^3 du filtrat, en général.

Distillation et dosage du bloc acétone + acide acétylacétique.

La prise d'essai est acidifiée par 3 à 4 gouttes d'acide sulfurique à 50 p. 100, on complète à 75 centimètres cubes. On place cette solution dans un ballon à distiller d'une contenance de 300 cm^3, auquel on adapte un réfrigérant. Ce réfrigérant se termine par un tube coudé assez long pour atteindre le fond d'une fiole jaugée de 25 ou de 50 cm^3, dans laquelle on a mis au préalable une garde d'eau distillée.

Pour le montage de l'appareil, on doit employer uniquement des bouchons de liège ou de caoutchouc recouvert de feuilles d'étain. Un volume de distillat de 25 cm^3 suffit généralement pour entraîner toute l'acétone présente. Lorsque le distillat a presque atteint le volume désiré, le tube coudé est débranché puis rincé avec quelques gouttes d'eau dans la fiole jaugée. On amène au trait de jauge.

On mesure 5 cm^3 de distillat dans un tube à essais, on y ajoute 5 cm^3 de lessive de soude à 32 p. 100 exactement mesurés, puis X gouttes d'aldéhyde salicylique. Des solutions de comparaison sont préparées simultanément. A partir d'une solution étalon contenant 0,01 mg. d'acétone par centimètre cube [1]. En prenant de 0,5 à 5 cm^3 de l'étalon, on prépare une série de dilutions allant de 0,005 à 0,05 milligramme. On prendra 5 cm^3 de ces dilutions pour la comparaison, réalisant ainsi la gamme de concentration : 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05 mg. d'acétone. On ajoute dans chacun de ces cinq tubes 5 cm^3 de lessive de soude et X gouttes d'aldéhyde salicylique, comme pour le distillat. Après agitation, les tubes sont plongés dans un bain-marie bouillant pendant 3 à 5 minutes.

Les tubes sont agités jusqu'à dissolution de l'aldéhyde salicylique. On laisse refroidir les tubes, on

---

1. Cette solution se conservant mal, l'auteur recommande de la renouveler tous les deux jours. Elle est préparée par dilution d'une solution contenant 0,1 mg. d'acétone par centimètre cube (stabilité : 1 mois). Cette dernière est, elle-même, obtenue à partir d'une solution-mère contenant 1 cm^3 d'acétone par litre (teneur déterminée par iodométrie).

filtre et l'on effectue les mesures colorimétriques en choisissant pour la mesure définitive la solution étalon qui, sous une épaisseur de couche de 15 mm., donnera une lecture comprise entre 11 et 19 mm.

Oxydation et dosage de l'acide β-hydroxybutyrique.

Après la première distillation, on remplace le ballon jaugé de 25 cm^3 par une fiole de 100 cm^3. On porte à l'ébullition le résidu de la distillation précédente, et l'on ajoute 30 cm^3 d'acide sulfurique à 50 p. 100 et graduellement 20 cm^3 d'une solution de bichromate de potassium à 0,2 p. 100, tout en maintenant une distillation lente. L'introduction de ces réactifs nécessite, pour éviter les pertes, l'emploi d'une ampoule à brome montée sur le col du ballon à distiller. Après 10 minutes, on ajoute 50 centimètres cubes de bichromate, et encore 50 cm^3 après 10 nouvelles minutes.

Ce procédé diffère de la méthode de Hubbard en ce que la distillation est conduite lentement (au moins 30 minutes), et par le volume du distillat, qui est de 100 cm^3. Lorsque le volume du distillat est presque atteint, le tube coudé est débranché et rincé, comme pour le premier dosage. L'acétone provenant de l'oxydation de l'acide β-hydroxybutyrique contenu dans la prise d'essai est dosé colorimétriquement sur 5 cm^3 du distillat, comme précédemment.

Méthode de URBACH [10]

Avant d'exposer la méthode de URBACH, nous devons décrire le photomètre de Pulfrich, que cet auteur utilise de préférence à un colorimètre, étant donné la supériorité bien connue de la photométrie sur la simple colorimétrie, du point de vue de l'objectivité.

Description du photomètre de Pulfrich.

Le photomètre de Pulfrich est optiquement disposé de telle sorte que la lumière, qui y pénètre par deux ouvertures photométriques (placées du côté opposé à l'observateur), parvienne jusqu'à un oculaire commun. En regardant à travers cet oculaire, l'observateur voit le champ lumineux divisé en deux plages demi-circulaires par une ligne de séparation verticale. Chacune de ces plages n'étant éclairée que par l'une des ouvertures d'entrée, il y a croisement des faisceaux lumineux dans l'appareil. Du côté de l'oculaire se trouve un porte-filtres spectraux. L'usage de huit filtres très sélectifs permet de découper autant d'étroites bandes de longueur d'onde dans le spectre visible. Le dispositif de mesure est constitué par les ouvertures photométriques manœuvrées par deux tambours identiques, qui permettent de faire varier l'intensité d'éclairement de ces deux demi-champs dans des proportions mesurables. Ces tambours sont gradués de telle sorte que la précision de la lecture, en pour cent, soit approximativement la même pour des liquides accusant une forte et une faible absorption. C'est pour cette raison que Pulfrich a dé-

signé l'instrument sous le nom de « Photomètre graduel » *(Stufen-Photometer)*.

Devant les ouvertures photométriques, sont disposés deux porte-cuves ; ces cuves sont à faces parallèles. L'une reçoit le liquide à examiner, et l'autre un liquide dit « de compensation ». Comme liquide de compensation pour les analyses colorimétriques, on emploie généralement le solvant utilisé pour la préparation de la solution à examiner, dans le cas où ce solvant accuse une couleur propre ou un trouble; sinon la cuve de compensation est simplement emplie d'eau.

Sur les cuves tombent deux faisceaux réglables issus d'une même source lumineuse, une lampe Nitra, grâce à un dispositif optique approprié.

Pour mesurer l'absorption de la lumière par un liquide coloré ,on verse celui-ci dans une cuve ayant l'épaisseur de couche indiquée par des essais préalables. On place cette cuve dans l'un des porte-cuves; dans l'autre se trouve le liquide de compensation. Dans les mesures photométriques, les pertes de lumière aux fenêtres des cuves et dans les solvants utilisés pour la préparation des réactifs sont précisément équilibrées par cette cuve de compensation.

Pour l'exécution des mesures, on interpose derrière l'oculaire, par rotation du révolver porte-filtre, le filtre spectral convenable.

Mise au point et Lecture.

Supposons la lampe réglée, on met au point sur la ligne de séparation des deux demi-champs, puis,

tout en observant constamment dans l'oculaire, on effectue une première mesure en tournant le tambour qui se trouve du côté de la cuve de compensation, jusqu'à obtenir l'égalité d'éclairement sur les deux demi-champs. Le tambour correspondant à la solution colorée est toujours amené à la graduation 100 correspondant à l'ouverture totale de la fenêtre photométrique. On note la lecture, on fait tourner encore le tambour de manière à dépasser quelque peu cette lecture, puis on recherche à nouveau l'égalité d'éclairement en venant, par conséquent, du côté opposé. On fait encore une troisième lecture en arrivant à l'égalité à partir des valeurs supérieures. La moyenne des deux dernières lectures donne, en général, la valeur exacte. Pour les dosages demandant une très grande précision, on répétera la mesure à plusieurs reprises, puis on intervertira les cuves et l'on effectuera encore une série de mesures sur l'autre tambour. On prendra alors pour résultat définitif la moyenne arithmétique entre les lectures obtenues sur les tambours de droite et de gauche. La lecture sur la graduation droite (noire) indique directement la « transparence » notée D p. 100 par Pulfrich. Sur la graduation rouge interne, on lit des « extinctions ».

Voyons rapidement la signification de ces termes: transparence (D) et extinction (E).

Soit I_0 l'intensité de la lumière frappant une couche de liquide, I l'intensité de la lumière existant encore après le passage à travers cette couche; on appelle transparence D le quotient $\frac{I}{I_0}$. La trans-

parence D d'un liquide ou son absorption pour la lumière d'une longueur d'onde déterminée, dépendant de l'épaisseur de couche à laquelle l'examen a été fait, il faut toujours avoir soin d'indiquer cette épaisseur.

Prenons un exemple pour montrer de quelle façon l'absorption dépend de l'épaisseur de la couche. Supposons qu'une solution examinée sous une épaisseur de couche de 1 cm. laisse passer la moitié de la lumière incidente et présente, par conséquent, une transparence de 0,50 ou de 50 p. 100. Le tableau suivant nous donnera les transparences D de la même solution pour des épaisseurs de couche différentes allant de 1 à 5 cm.

EPAISSEUR de la couche	S = 1 cm	2 cm	3 cm	4 cm	5 cm
D en p. 100....	50	25	12,5	6,25	3,125
D en fraction décimale	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125
D exprimé par les puissances de la transparence pour 1 cm....	$(0,50)^1$	$(0,50)^2$	$(0,50)^3$	$(0,50)^4$	$(0,50)^5$

Cet exemple permet de reconnaître la loi suivante : si D_1 est la transparence observée pour une épaisseur de couche de 1 cm., la transparence D_s observée pour une épaisseur de couche de s centimètres est :

(1) $$D_s = (D_1)^s$$

En prenant les logarithmes des deux membres de cette équation, on aura :

(2) $$\log D_s = s \log D_1$$

La transparence D lue sur le tambour du photomètre n'est donc pas une fonction linéaire de l'épaisseur de la couche *s*. La loi de proportionnalité ne vaut que pour les logarithmes.

De l'équation (2), on tire :

(3) $$\log D_1 = \quad \log D_s$$

La transparence D_s est toujours plus petite que 1, le logarithme de cette valeur serait, par conséquent, toujours négatif. Pour éviter l'emploi des nombres négatifs, on utilise le logarithme changé de signe, et l'on appelle extinction E cette nouvelle grandeur.

$$E = (-\log D)$$

L'extinction, comme la transparence, correspond à une certaine épaisseur de couche.

On appellera coefficient d'extinction « K » la valeur de l'extinction pour une épaisseur de couche de 1 cm. Les valeurs de l'extinction (et du coefficient d'extinction) se calculent à partir de la transparence mesurée au moyen des tables de logarithme, ou se lisent directement sur les tables dressées par Pulfrich. Les modèles récents de photomètre portent sur leurs tambours une graduation en extinction, comme nous l'avons signalé plus haut.

Détermination de la concentration.

On peut déterminer la concentration, soit par multiplication des lectures photométriques par un coefficient numérique, quand la loi de Beer s'applique; soit à l'aide d'une courbe d'étalonnage, ou ce qui revient au même, avec des tables d'étalonnage.

Détermination de la concentration à l'aide de courbes d'étalonnage.

Ce procédé est très commode. Il suffit d'effectuer une fois pour toutes, des mesures sur une série de solutions de concentration connue convenablement échelonnées. On porte ensuite les concentrations en abscisses sur du papier quadrillé en millimètres et les lectures correspondantes en ordonnées, et l'on relie les divers points par une courbe. Par précaution, il est prudent d'inscrire aussi sur cette feuille l'épaisseur efficace des cuves et le filtre à l'aide duquel la courbe d'étalonnage a été établie.

Lorsqu'on établit la courbe d'étalonnage avec l'extinction E ou le coefficient d'extinction, la ligne reliant les divers points est une droite passant par l'origine, si la loi de Beer est valable.

Détermination de la concentration à l'aide du calcul.

Suivant la loi de Beer, les coefficients d'extinction de deux solutions de la même substance ont entre eux le même rapport que les concentrations. Si K_1 est le coefficient d'extinction d'une solution de concentration connue c_1, on peut calculer la concentration c_2 d'une solution donnant, avec le

même filtre, le coefficient d'extinction K_2 au moyen de la formule suivante :

$$c_2 = \frac{c_1}{K_1} \cdot K_2$$

Mais le calcul de la concentration au moyen de cette formule n'est possible que si la loi de Beer est rigoureusement applicable; sinon le dosage devra être fait avec des courbes d'étalonnage déterminées empiriquement.

Technique du dosage de l'acétone dans l'urine selon Urbach.

Cet auteur ne donne pas de technique de dosage de l'acide β-hydroxybutyrique. La condensation de l'acétone et de l'aldéhyde salicylique s'effectue en milieu alcoolique, comme dans la vieille méthode de Czonka [11].

Voici le mode opératoire donné par l'auteur : à 100 cm³ d'urine prélevée sur les urines de 24 heures, on ajoute, dans un ballon à distiller, 200 cm³ d'eau distillée et 5 cm³ d'acide sulfurique concentré. On distille pendant 20 minutes. Le distillat est reçu dans un ballon à long col garni préalablement de 25 cm³ d'eau distillée. On complète le distillat à 200 cm³. On en prélève 2 cm³, que l'on mélange à 2 cm³ de lessive de potasse à 63,6 gr. p. 100 cm³ et à 1 cm³ d'une solution d'aldéhyde salicylique à 10 p. 100 en poids dans l'alcool à 95°. On chauffe ce mélange au bain-marie à 50° C pendant exactement 20 minutes (pas davantage), en agitant fréquemment jusqu'à apparition de la couleur rouge. On refroidit, et l'on complète à 15 cm³.

On procède ensuite à l'examen photométrique avec filtre S-53, sous une épaisseur de couche de 20 mm., puis, à titre de contrôle, avec filtre S-50 sous une épaisseur de couche de 5 mm., avec une solution de compensation préparée de la manière suivante : 10 cm³ de solution alcoolique d'aldéhyde salicylique + 20 cm³ de lessive de potasse, et 120 centimètres cubes d'eau distillée.

ÉTUDE COMPARATIVE DES MÉTHODES DE BEHRE ET DE URBACH

CONTROLES EXPÉRIMENTAUX

Préparation de solutions titrées d'acétone.

Nous avons préparé une solution-mère contenant 1 p. 1000 d'acétone en poids (détermination iodométrique). A partir de cette solution-mère, nous avons établi une gamme de dilutions contenant :

10 γ d'acétone par cm³
5 γ — —
1 γ — —

Cette gamme se conserve très mal et doit être renouvelée chaque jour. Nos solutions ont été faites avec de l'eau bidistillée.

Pour contrôler les méthodes de Behre et d'Urbach, nous avons pris huit tubes à essais répartis en deux séries de quatre. Dans la première série, nous avons réalisé des mélanges selon les indications de Behre :

Tubes	Acétone	Eau bi-distillée	Soude 32 p. 100	Aldéhyde salicylique
1	5 γ	5 cm³	5 cm³	X gttes
2	25 γ	»	»	»
3	50 γ	»	»	»
4	0 γ	»	»	»

Ensuite les tubes étaient plongés dans un bain-marie bouillant pendant 5 minutes, tout en maintenant une agitation fréquente afin de dissoudre l'aldéhyde salicylique. Nous avons trouvé un grand avantage à utiliser, pour la dissolution des grumeaux qui se forment, des petits morceaux de baguette de verre de 5 cm. environ placés au fond du tube; on réalise ainsi un brassage efficace et commode. Après refroidissement, le contenu des tubes est filtré de façon à avoir un liquide clair pour la colorimétrie.

Dans la deuxième série de tubes, nous avons opéré selon les indications d'Urbach, c'est-à-dire en employant 2 cm³ d'une solution d'aldéhyde salicylique à 1 p. 10 en poids dans l'alcool à 95°, et en maintenant les tubes au bain-marie à 50° pendant 20 minutes. Après refroidissement, nous avons également filtré pour avoir des liquides parfaitement limpides.

Les extinctions de toutes ces solutions colorées obtenues selon Behre et Urbach ont été détermi-

nées au photomètre de Pulfrich, en employant des cuves de 20 mm. avec le filtre n° 3 (S-50). La cuve de comparaison contenant chaque fois le témoin correspondant, nous avons fait trois lectures, la solution-témoin placée à gauche, puis placée à droite.

Voici la moyenne des valeurs d'extinction lues :

Teneur en acétone	Tubes (Behre)	Extinction	Tubes (Urbach)	Extinction
5 γ	1	0,39	5	0,14
25 γ	2	1,15	6	0,72
50 γ	3	2,4	7	1,50

Avec ces valeurs d'extinction nous avons tracé des courbes d'étalonnage selon la méthode indiquée précédemment.

Interprétation des résultats donnés par ces méthodes.

En examinant la courbe I donnant les valeurs d'extinction obtenues avec la méthode de Behre, nous remarquons un accident pour les faibles concentrations, alors que l'autre courbe est parfaitement rectiligne. D'où vient cette irrégularité ?

Nous avons remarqué que l'aldéhyde salicylique ne se dissout pas entièrement dans la soude en milieu aqueux, la solution tenant en suspension de fines particules d'aldéhyde salicylique plus ou moins

résinifiées. Ce sont ces particules qui, fixant une partie du produit coloré, perturbent les lectures photométriques pour les faibles valeurs. D'ailleurs, si l'on retarde la filtration, les produits de polymérisation de l'aldéhyde précipitent en entraînant la majeure partie du produit coloré, alors que les solutions alcooliques ne se troublent pas.

D'autre part, la condensation de l'aldéhyde salicylique et de l'acétone est beaucoup plus lente en milieu alcoolique qu'en milieu aqueux. Les 20 minutes de chauffage à 50° au bain-marie préconisés par Urbach ne conduisent pas au maximum de coloration pour les faibles concentrations. Même en 30 minutes, on n'atteint pas l'intensité de la coloration obtenue en milieu aqueux. A concentration égale, l'intensité de la coloration est toujours plus faible en milieu alcoolique. C'est ce qu'indiquent, d'ailleurs, les courbes des extinctions : pour une même concentration, la courbe I (eau) donne des valeurs d'extinction plus élevées que la courbe II (alcool).

Au total, de l'étude comparative des méthodes fondées sur la réaction de l'aldéhyde salicylique en milieu alcalin, il ressort que la formation du dihydroxydi-benzène-acétone est plus rapide en milieu aqueux qu'en milieu alcoolique, et que, d'autre part, la coloration y est plus intense. La solution obtenue en milieu alcoolique permet toutefois des déterminations plus sûres pour les faibles concentrations, comme le montre la courbe II, parfaitement régulière. Or, ce sont précisément les faibles concentrations qui nous intéressent.

Nous avons pensé qu'il était possible d'élaborer une variante personnelle de la méthode à l'aldéhyde salicylique, combinant les avantages de chacune des méthodes précédentes et évitant leurs inconvénients.

MODIFICATION PERSONNELLE DE LA MÉTHODE DE DOSAGE DES CORPS CÉTONIQUES PAR L'ALDÉHYDE SALICYLIQUE

Dans notre modification, au lieu d'introduire d'emblée l'alcool comme solvant de l'aldéhyde salicylique à la manière d'Urbach, nous réalisons d'abord la réaction colorée, exactement comme J.-A. Behre, c'est-à-dire en milieu purement aqueux, ce qui nous procure une intensité maxima dans le minimum de temps. Mais, une fois la réaction achevée, nous ajoutons de l'alcool, ce qui n'abaisse la teinte que par un simple phénomène de dilution. Le gain du côté de la fidélité, dû à l'absence de précipitation, compense largement cette légère perte de sensibilité.

Voici le détail de notre mode opératoire définitif et, en même temps, le tableau des mesures qui nous a permis de tracer la courbe d'extinction utilisée dans la suite de notre travail.

Mode opératoire

Dans un tube de verre pyrex de 18 cm. × 16 mm. muni d'un petit agitateur de 5 cm., on introduit :

5 cm^3 de solution acétonique titrée ou de distillat d'urine amené à un volume déterminé;

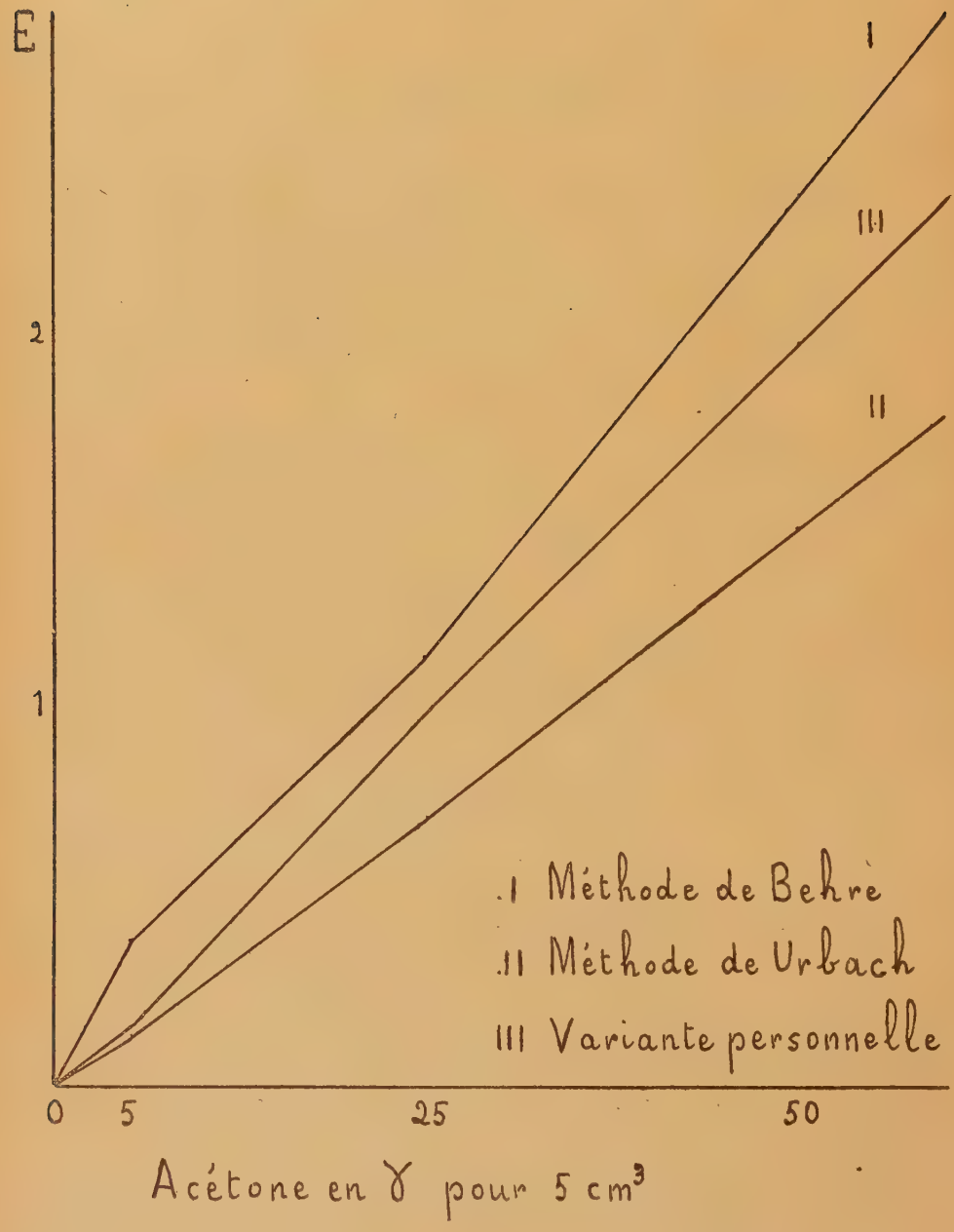
5 cm³ de soude à 32 p. 100 ;
X gouttes d'aldéhyde salicylique.

On place le tube au bain-marie bouillant durant 5 minutes, en agitant fréquemment. Après refroidissement, on ajoute 2 cm³ d'alcool à 95°, on agite pour homogénéiser et jusqu'à dissolution des particules d'aldéhyde résinifié en suspension, puis on filtre sur un petit filtre plissé. Le filtrat recueilli est prêt pour la photométrie.

Des témoins pour la cuve de compensation renfermant les mêmes constituants, sauf l'acétone (solution titrée ou distillat), sont préparés d'une façon exactement identique.

Valeurs de l'extinction de solutions d'acétone de concentration correspondant au domaine de l'excrétion physiologique (courbe III), examinées avec filtre N° 3 (S-50) sous une épaisseur de couche de 20 mm.

Acétone	Extinction
5 γ	0,16
25 γ	1
50 γ	2


E
2
1
I
III
II
0
5
25
50
I Méthode de Behre
II Méthode de Urbach
III Variante personnelle
Acétone en γ pour 5 cm³

DEUXIÈME PARTIE

LE TAUX DE L'ACÉTONURIE PHYSIOLOGIQUE

Ayant choisi une technique de dosage répondant aux conditions de sensibilité et de spécificité en rapport avec les faibles quantités de substance à doser, et, d'autre part, suffisamment commode et rapide pour s'appliquer à des dosages en série, nous allons pouvoir l'appliquer à la détermination du taux des corps cétoniques de l'urine chez un certain nombre de sujets normaux dont nous avons pu recueillir l'urine émise en vingt-quatre heures avec toutes les garanties nécessaires, ce qui a forcément limité notre enquête. Mais, auparavant, nous allons donner les résultats numériques relatifs à l'acétonurie physiologique, que nous avons pu trouver dans la littérature biochimique.

TAUX DE L'ACÉTONURIE PHYSIOLOGIQUE

RÉSULTATS ANTÉRIEURS

Selon Peters et Van Slyke [12] l'excrétion des corps cétoniques totaux exprimée en acide β-hydroxybutyrique est ordinairement inférieure à 0,50 gramme par 24 heures, et probablement ne dépasse 1 gr. que dans des cas exceptionnels chez l'homme sain.

Shaffer [13] considère comme anormal un taux d'acétone totale dépassant 0,1 gr. par jour.

Hubbard et Noback [14] trouvent une élimination normale allant de 0,00 à 3,8 mg. par 100 cm^3 d'urine pour l'acétone totale ; l'acétone et l'acide acétylacétique allant de 0,00 à 1,2 mg. avec une

moyenne de 0,19 mg., et l'acide β-hydroxybutyrique (exprimé en acétone) allant de 0,00 à 2,6 mg. avec une moyenne 0,46 mg. pour 100 cm³ d'urine.

On remarquera l'ambiguïté des termes utilisés par ces auteurs pour désigner les fractions qu'ils considèrent.

J.-A. Behre [15] a étudié l'excrétion de l'acétone et de l'acide acétylacétique chez 12 sujets normaux pendant 24 heures, elle a étudié également l'excrétion de l'acide β-hydroxybutyrique de 8 autres sujets. Voici ses résultats :

Corps cétoniques excrétés en 24 heures
en milligrammes d'acétone

		Moyenne
Acétone + acide acétylacétique	1,2 à 4,5	2,9
Acide β-hydroxybutyrique	12,2 à 20,5	16,2
Corps cétoniques totaux	14,5 à 23,5	19,4

Corps cétoniques par 100 cm³ d'urine
en milligrammes d'acétone

		Moyenne
Acétone + acide acétylacétique	0,10 à 0,66	0,25
Acide β-hydroxybutyrique	0,79 à 2,20	1,30
Corps cétoniques totaux	0,91 à 2,70	1,50

Valdiguié [16] donne comme chiffres :

	Acétone + acide acétylacétique en mg p. 1.000	Acide β-hydroxybutyrique en mg p. 1.000
Sujet I.	8,5	35,2
— II.	6,8	25,7
— III.	7,7	31,4

Toscano [17] donne :

	en mg p. 100	en mg p. 24 h.
Acétone + acide acétylacétique	0,6	6,68
Acide β-hydroxybutyrique	4.85	52,94

En présence des résultats si divergents indiqués par des auteurs dignes de foi, une première remarque s'impose : elle est d'ordre méthodologique. C'est l'emploi de méthodes de dosage très différentes qui est, certainement, la cause essentielle des divergences. Nous avons vu, en effet, combien le dosage des corps cétoniques est délicat. L'iodométrie en particulier, si tentante à cause de sa sen-

sibilité, manque de spécificité, et ce n'est que grâce à des distillations successives, incompatibles avec les besoins de l'expérimentation en série, qu'on lui rend cette spécificité. C'est pourtant à l'iodométrie qu'ont eu recours la plupart des auteurs, et cela suffit à expliquer la divergence de leurs résultats : des substances réductrices volatiles. sont venues perturber leurs déterminations. Ici, comme toujours lorsqu'il s'agit de comparaisons, il faut sous-entendre que non seulement le mode d'expression des résultats analytiques, mais aussi les appareils et méthodes de mesure, sont les mêmes dans tous les cas. C'est une des raisons qui nous ont fait adopter la méthode de Behre (avec notre modification). On peut considérer que les résultats de nos dosages sont vraiment comparables à ceux de cet auteur, qui s'est occupé de façon toute particulière de l'acétonurie physiologique.

Mais il faut se conformer aux exigences de la pratique journalière. Ce n'est pas à un dosage que l'on demandera, dans chaque cas clinique, de décider si l'acétonurie est physiologique ou pathologique; c'est à une réaction facile à mettre en œuvre. En fait, la réaction de Legal au nitro-prussiate sous sa forme primitive, ou ses variantes comme celle d'*I*mbert & Bonnamour, constitue un moyen d'appréciation suffisant. Nous dirons, avec nos devanciers, qu'il y a acétonurie pathologique si la réaction de Legal est positive. Le clinicien pourra dire qu'il n'y a pas d'acétonurie tout court si la réaction est négative; mais, pour le physiologiste, il n'y aura pas de doute sur la valeur de cette expression. Pour

lui, réaction de Legal négative signifie seulement que l'acétonurie est dans les limites physiologiques. Mais, lorsque l'on passera à l'évaluation numérique, le taux limite correspondant à la négativité de la réaction de Legal variera évidemment suivant la méthode de dosage utilisée.

C'est ainsi que, pour Guillaumin [18] : « la limite de sensibilité de la réaction de Legal, qu'elle soit effectuée selon le mode indiqué par Denigès, ou selon la modification d'Imbert & Bonnamour à l'ammoniaque, est de 0,04 gr. à 0,05 gr. par litre (exprimé en acétone), s'abaissant même à 0,02 gr. dans certaines urines déféquées. »

Mais, comme l'a remarqué J.-A. Behre [19], le degré d'acétonurie nécessaire pour donner une réaction positive au nitroprussiate, varie selon la méthode et les proportions relatives d'acétone et d'acide acétylacétique, et se trouve généralement aux environs de 3 à 5 mg. d'acide acétylacétique pour 100 cm^3 d'urine.

Il est bien connu, depuis Denigès [20], que la réaction au nitroprussiate et dix-huit fois moins intense avec l'acétone qu'avec l'acide acétylacétique en quantité équi-moléculaire.

Mais il ne faut pas oublier que la réaction de Legal ne renseigne en rien sur la présence de l'acide β-hydroxybutyrique, c'est-à-dire sur le plus abondant des trois corps cétoniques. On ne doit donc lui attribuer qu'une valeur conventionnelle nécessitée par les besoins de la clinique. Du point de vue de la physiologie, il ne saurait en être de même.

RÉSULTATS PERSONNELS

Nous avons étudié l'élimination urinaire des corps cétoniques de 9 sujets d'âge différent allant de 18 à 83 ans, tous en bonne santé apparente et suivant le régime alimentaire habituel de nos contrées. Les réactions de Benedict et de Legal, pratiquées sur leurs urines, étaient négatives.

Cependant, un de nos sujets (n° 6) était un diabétique au régime, ne présentant plus de glycosurie depuis plusieurs mois. L'échantillon de son urine que nous avons analysé avait une réaction de Benedict et une réaction de Legal négatives. Cette urine nous a semblé intéressante, car elle n'était pas pathologique selon nos conventions, bien que provenant d'un sujet diabétique.

Toutes nos urines ont été recueillies avec les précautions classiques, et représentent l'excrétion urinaire d'une période de 24 heures allant de 8 heures à 8 heures du matin.

Le tableau suivant résume les résultats de ces expériences :

Sujets	Volume urine 24 heures	Acétone + Acide acétylacétique en mg.		Acide β-hydroxybutyrique en mg.		Corps cétoniques totaux en mg.	
		par litre	par 24 h.	par litre	par 24 h.	par litre	par 24 h.
1	1.500	1,5	2,25	23,0	34,5	24,5	36,75
2	1.100	0,5	0,75	13,5	14,85	14,0	15,60
3	1.500	1,0	1,5	12,0	18,0	13,0	19,50
4	1.000	3,0	3,0	46,0	46,0	49,0	49,0
5	1.200	3,0	3,60	30,0	36,0	33,0	39,60
6	1.400	3,75	5,15	45,0	63,0	48,75	68,15
7	900	2,0	1,80	24,0	21,6	26,0	25,40
8	1.075	1,75	1,88	22,5	24,18	24,25	26,1
9	1.250	0	0	12,0	15,0	12,0	15,0
moyennne		1,83	2,21	25,33	30,34	27,16	32,55

L'élimination ne semble pas influencée par l'âge ou le sexe. Sauf pour le cas n° 9 (83 ans), où le taux d'excrétion des corps cétoniques est très faible, dû uniquement à une excrétion d'acide β-hydroxybutyrique, l'acétone totale étant indosable. Mais il serait imprudent d'en tirer une conclusion relative à l'influence de l'âge, car le sujet n° 8 a 80 ans, et son excrétion ne se distingue pas de façon essentielle de celle de sujets plus jeunes.

Quelles sont les variations chez un même sujet, gardant évidemment le même régime? Le cas n° 1, examiné à deux jours d'intervalle, n'a montré qu'une légère variation dans l'excrétion. Nous avons noté une élimination d'acétone par vingt-quatre heures; une fois de 4 mg., l'autre fois de 2,25 mg. et en acide β-hydroxybutyrique de 24 mg. au lieu de 34,5, les corps cétoniques totaux étant de 28 mg. au lieu de 36,75.

On voit qu'en utilisant une méthode sensiblement identique à celle de Behre (le principe est conservé, seul le mode opératoire est modifié), nous avons obtenu, avec des sujets de nos contrées, des résultats tout à fait analogues à ceux que J.-A. Behre a observés en Amérique du Nord ; c'est-à-dire dans un pays où le régime moyen est très différent du nôtre. Cette constatation est évidemment en faveur d'une indépendance, sinon totale, du moins partielle, de l'acétonurie physiologique vis-à-vis du régime. Une expérience personnelle, relatée dans la troisième partie de notre travail, semble aussi en faveur de cette opinion.

TROISIÈME PARTIE

L'ORIGINE DE L'ACÉTONURIE PHYSIOLOGIQUE

Cette excrétion de corps cétoniques par l'individu sain, que nous venons de constater à notre tour et d'évaluer, à quel processus métabolique convient-il de la rattacher ? L'origine de ces corps est-elle la même que chez le diabétique grave et chez l'individu en état de jeûne glucidique, ou s'agit-il d'un mécanisme de formation latérale ?

Pour répondre à ces questions, il faut considérer au préalable les théories actuellement proposées pour rendre compte de la présence des corps cétoniques dans l'urine du diabétique ou du jeûneur. Alors seulement nous pourrons essayer d'interpréter l'acétonurie physiologique.

LE MÉTABOLISME INTERMÉDIAIRE DES ACIDES GRAS, PRÉCURSEURS DES CORPS CÉTONIQUES

C'est dans un bloquage du métabolisme intermédiaire des acides gras issus des graisses ou des protides désaminés, que l'on voit actuellement l'origine de l'acétonurie. Mais il s'en faut que la question soit aussi simple qu'à l'époque où la seule β-oxydation rendait compte de la dégradation des acides gras dans l'organisme animal. Procédant par ordre, nous allons rappeler brièvement les fondements expérimentaux de la théorie de l'oxydation en β, puis nous passerons à l'exposé des variantes cataboliques découvertes dans ces dernières années

pour ces mêmes acides gras. Enfin, nous exposerons les vues émises tout récemment par KREBS sur la possibilité d'une origine glucidique des corps cétoniques. Cette conception est évidemment révolutionnaire en la matière, car c'est précisément à une intervention des glucides que l'on rapporte classiquement l'achèvement de la dégradation des acides gras, arrêtée, sans cela, au stade acétylacétique et β-oxybutyrique.

En somme, à côté d'un rôle anticétogène, les glucides seraient doués d'un rôle cétogène. Il y a là de quoi rendre fort perplexe.

Par une expérience, qui clôturera cette partie de notre étude, nous avons essayé une vérification indirecte du bien-fondé de l'hypothèse si ingénieuse de KREBS.

LA THÉORIE CLASSIQUE DE LA β-OXYDATION (KNOOP)

Nous nous contenterons de rappeler, dans ses grandes lignes, cette théorie de la β-oxydation, aujourd'hui tout à fait classique. Son exposé est indispensable à la compréhension de la cétogénèse.

On sait que, pour déceler dans l'urine les déchets du métabolisme des acides gras, KNOOP eut l'idée de « marquer » ceux-ci en substituant sur le groupement méthyl un noyau benzénique empêchant la combustion totale de l'acide ainsi phénylé. KNOOP constata ainsi que les acides gras à nombre pair

de carbone, donnent de l'acide phénylacétique (excrété par conjugaison avec le glycocolle sous forme d'acide phénacéturique), tandis que si la chaîne est impaire, l'oxydation donne de l'acide benzoïque (excrété sous forme d'acide hippurique par conjugaison glycocollique). KNOOP en a conclu que l'oxydation coupe la chaîne entre le carbone α et le carbone β, passant de l'acide en C_{18} à celui en C_{16} et ainsi de suite, jusqu'à ce que l'on « bute » sur le noyau, de telle sorte qu'une nouvelle coupure de 2 carbone soit impossible. Cette vue de KNOOP est confirmée, entre autres, par des expériences d'*EMBDEN* sur la perfusion du foie, et par celles de DAKIN sur l'oxydation des acides gras par l'eau oxygénée, qui, elle aussi, oxyde en β.

On conçoit aussi comment un acide gras naturel, c'est-à-dire pair, va donner naissance par suite de son oxydation progressive à de l'acide butyrique, les maillons à deux carbones détachés chaque fois étant brûlés au fur et à mesure.

Reste à expliquer, maintenant, pourquoi chez l'individu sain l'oxydation de l'acide butyrique se poursuit jusqu'aux termes CO_2 et H_2O, et pourquoi chez le diabétique grave il y a, au contraire, accumulation des produits oxydés de même condensation en carbone que l'acide butyrique, à savoir l'acide acétylacétique et l'acide β-hydroxybutyrique (la formation de l'acétone à partir de l'acide acétylacétique n'étant qu'une réaction secondaire de décarboxylation sans rapport avec le phénomène d'oxydation).

Mais, avant de répondre à cette question, il nous faut reconnaître que si la théorie de KNOOP tient toujours, elle n'en a pas moins été fortement discutée dans ces dernières années. De divers côtés, des expérimentateurs sont venus jeter le doute sur l'exclusivité de l'oxydation en β. Ce sont ces vues nouvelles que nous allons exposer maintenant avec un peu plus de détails, parce qu'elles ne sont pas encore devenues classiques. Elles sont de nature à modifier notre conception de la cétogenèse.

THÉORIES DE L'OXYDATION DES ACIDES GRAS AUTRES QUE LA β-OXYDATION

L'OXYDATION ALTERNÉE MULTIPLE DE JOWETT ET QUASTEL

Lors de l'oxydation en β progressive d'un acide gras pair, il y a formation d'une seule molécule d'acide acétylacétique, quelle que soit la longueur de la chaîne primitive. Or, l'expérience montre que les acides caprylique, caprique et laurique engendrent davantage d'acide acétylacétique que le butyrique ou le caproïque. Ces expériences ont été faites sur l'animal intact (BRENTANO, HALLMAN, BUTTS et MURRAY [21]) et sur des coupes de foie (JOWETT et QUASTEL [22]). Pour expliquer cette « surproduction » de corps cétoniques, JOWETT et QUASTEL rejettent l'oxydation récurrente. Ils font remarquer que des termes successifs de la récurrence nous ne pouvons saisir un seul témoin, et pourtant, avec

les intermédiaires exigés par le mécanisme intime de l'oxydation déshydrogénation suivies d'hydratation, il y a des dizaines d'intermédiaires. C'est là, d'ailleurs, une des pierres d'achoppement de la théorie de KNOOP, entrevue depuis longtemps. Pour lever la difficulté, il suffit d'admettre ce que JOWETT et QUASTEL appellent la « multiple alternate oxidation ». Il y aurait oxydation simultanée des carbones de 2 en 2. Par exemple, l'acide en C_8, c'est-à-dire l'acide caprylique, serait oxydé de la façon suivante :

$$\overset{\qquad\qquad\qquad

lité d'obtention de l'acide undécanoïque) que Verkade constata l'excrétion d'acide undécanedioïque. Seule une oxydation en ω conforme au schéma :

$$CH_3 - (CH_2)_9 - COOH \xrightarrow{\omega} HOOC - (CH_2)_9 - COOH$$

pouvait expliquer cette « diacidurie ».

Verkade a étudié dans les mêmes conditions les graisses formées avec les homologues supérieurs et inférieurs de l'acide undécanoïque. Fait remarquable. ce sont les termes en C_{10} (tricaprine) et en C_{11} (triundécyline) qui ont la plus forte action diacidogène. Le hasard avait fait tomber Verkade sur un des termes intéressants.

Flaschentrager et Bernhard [24] ont étendu ces recherches, et ont montré que l'acide décanedicarboxylique issu du décanoïque subissait à son tour une oxydation en β par les deux bouts conduisant à l'acide adipique, que l'on trouve dans l'urine en même temps que du diacétyle. La production de ce dernier corps ne peut s'expliquer que par une ββ'-oxydation accompagnée de décarboxylation de l'acide adipique.

$$\begin{array}{c} \overset{\beta'}{} \quad \overset{\beta}{} \\ HOOC - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COOH \\ \Downarrow \\ |HOO|C - CH_2 - CO - CO - CH_2 - |COO|H \\ \Downarrow \\ CH_3 - CO - CO - CH_3 \end{array}$$

En somme, le résultat obtenu par Knoop dans l'ingestion des acides ω-phényl substitués, c'est-à-

dire la β-oxydation unilatérale, était la conséquence du blocage du méthyle terminal, rendant l'ω-oxydation impossible. KNOOP avait, d'ailleurs, fait les réserves voulues, lorsqu'il publia ses résultats obtenus avec ses acides artificiels.

LA DÉSATURATION (LEATHES)

On a coutume, depuis LEATHES [25], d'assigner aux acides gras non saturés du type oléique, un rôle d'intermédiaire dans la dégradation des acides gras. Comme ils sont toujours présents dans les phospholipides, on répète que ces derniers sont des machines à brûler les graisses, la double liaison créant un point faible où la chaîne carbonée doit se couper. On conçoit immédiatement, et c'est ce qui nous intéresse ici, une possibilité de cétogenèse doublée pour chaque double liaison créée.

Mais les acides naturels désaturés ne semblent pas jouer un tel rôle. Si l'on fait ingérer à des souris de l'acide oléique contenant du deutérium, l'acide au lieu d'être coupé est hydrogéné, transformé en stéarique (RITTENBERG & SCHŒNHEIMER [26]). On conçoit mal l'économie de ce processus synthétique si l'acide oléique était un terme de dégradation. En fait, il semble bien que les acides gras naturels désaturés, constituants des phospholipides, n'ont pas une signification d'intermédiaires métaboliques. La désaturation qui engendre l'acide oléique n'est pas la première étape d'une oxydation par déshydrogénation. Cela n'exclut pas le rôle de la désaturation dans la dégradation des acides gras,

mais celle-ci se fait entre le carbone α et le carbone β, comme l'admettent tous les auteurs qui ont étudié le mécanisme intime de la β-oxydation, et non en milieu de chaîne, comme le nécessiterait la formation d'acide oléique par exemple.

Nous n'avons pas insisté sur le mécanisme de la β-oxydation et les déhydrases qui le permettent, car le détail intime des processus est en dehors des limites du sujet qui nous occupe ici.

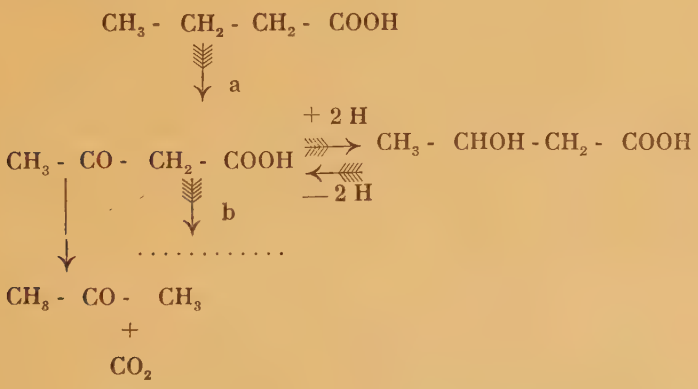
LA CÉTOLYSE

Les diverses conceptions de la dégradation des acides gras diffèrent entre elles par les mécanismes, mais toutes les voies qu'elles tracent nous ont mené au stade en C_4. Seules diffèrent les proportions de corps en C_4 produites, la vieille β-oxydation en engendrant le minimum ; l'oxydation alternée, le maximum. Au point de vue du résultat qualitatif, elles se valent.

Reste maintenant à expliquer ce qui se passe lorsque l'on a atteint le stade en C_4. Cette question est certainement l'une des plus complexes de la chimie biologique dynamique : deux métabolismes celui des lipides et celui des glucides, venant s'intriquer à ce niveau. Nous allons essayer d'exposer les vues actuelles sur ce problème, qui est proprement celui de la cétogenèse et de la cétolyse.

Alors que les termes intermédiaires oxydés en β disparaissent par le jeu d'un système diastasique approprié tant que la condensation en carbone est

supérieure à C_4, il faut, lorsque l'on est arrivé à l'acide acétylacétique, l'intervention d'une copule glucidique, ou dérivé des glucides. Les ouvrages classiques ont coutume de passer sous silence cette différence de comportement des produits oxydés en β, suivant la longueur de la chaîne. D'ailleurs, une des raisons qu'a invoquée QUASTEL lorsqu'il a proposé son oxydation alternée, c'est précisément que l'on ne saisit jamais de termes intermédiaires avant ceux en C_4. Quoi qu'il en soit, la présence d'acide acétylacétique dans l'urine du diabétique grave ou du jeûneur oblige à considérer la série de réactions :



Rappelons, car c'est un résultat aussi classique, que l'acide acétylacétique est le composé primitif. L'acide β-oxybutyrique n'est qu'un produit de réduction, comme le montre la perfusion du foie. L'existence d'un équilibre d'oxydoréduction entre ces deux corps doit d'ailleurs les faire considérer comme un bloc. Quant à l'acétone, c'est le produit d'une réaction secondaire de décarboxylation.

La difficulté commence lorsqu'on veut décrire les étapes auxquelles conduit la flèche *b*, étapes qui doivent conduire à CO_2 et H_2O. L'expérimentation physiologique montre que, par perfusion du rein et des muscles, l'acide acétylacétique disparaît. La masse des muscles intervenant, c'est donc surtout à ce tissu qu'il faut rapporter la cétolyse (Snapper).

Rappelons les explications classiques de Ringer et de Shaffer.

Pour Ringer, il y aurait condensation du glucose porteur d'une fonction aldéhyde avec l'acide β-oxybutyrique. C'est le glucoside ainsi formé qui « brûlerait ». Cette théorie est périmée : on sait, en effet, actuellement, qu'il y a de nombreux stades intermédiaires dans la dégradation du glucose; la nécessité d'une molécule de glucose par molécule d'acide gras, si l'on admet l'oxydation en β qui donne le pourcentage le moins élevé d'acide β-oxybutyrique, rend, d'ailleurs, la théorie de Ringer invraisemblable.

Shaffer, dont les travaux sont plus récents [27], admet que ce sont deux aldéhydes en C_3 issus du glucose qui se combinent cette fois-ci à l'acide acétylacétique, c'est-à-dire que l'action anticétogène du glucose double. En fait, les acides triosephosphoriques, qui ont été reconnus, depuis, comme les vrais intermédiaires, ne se combinent pas à l'acide acétylacétique.

La théorie du produit de condensation a été reprise plus récemment par Henze [28]. Cet auteur

a montré, *in vitro,* une condensation du méthylglyoxal, et l'acide pyruvique, qui a détrôné le méthylglyoxal dans le métabolisme intermédiaire des sucres, se comporterait de même avec l'acide acétylacétique.

$$CH_3 - CO - CHO + CH_3 - CO - CH_2 - |COO|H$$

$$\xrightarrow{-CO_2} CH_3 - CO - CHOH - CH_2 - CO - CH_3 + CO_2$$

$$\xrightarrow[\text{oxyd.}]{} 2\,CH_3 - CO - COOH$$

Cette fois, l'intermédiaire n'est pas une vue de l'esprit : le « Ketol » de Henze a été isolé. Mais il est bien hardi de transposer à l'être vivant cette expérience *in vitro.*

Nous n'avons pas, ici, à faire une revue générale de l'action anticétogène des glucides. Nous conclurons donc à noter ignorance sur le mécanisme intime de la cétolyse.

THÉORIE

DE LA COMPÉTITION DES SUBSTRATS

Une explication très originale de la cétogenèse a été proposée récemment par un élève de H.-A. Krebs, Edson [29].

A la suite d'expériences faites sur des coupes de foie de rats mises en présence d'acides gras et de divers substrats de nature ou d'origine glucidique, Edson conclut que tout se passe comme si les sub-

strats entraient en compétition pour les systèmes oxydants. Par suite du jeu des vitesses de réaction, ce sont les glucides présents qui sont brûlés de façon préférentielle, et il n'y a pas de cétogenèse puisqu'il n'y a pas, ou pratiquement pas, d'oxydation d'acides gras. Si les glucides viennent à manquer, ce sont alors les acides gras qui brûlent. Le tissu musculaire et rénal n'arrivant pas à dégrader suffisamment vite les corps cétoniques, il y a cétonémie et cétonurie.

On ne voit pas, actuellement, une expérience sur l'animal entier qui permettrait de vérifier cette hypothèse dynamique, si séduisante par ailleurs.

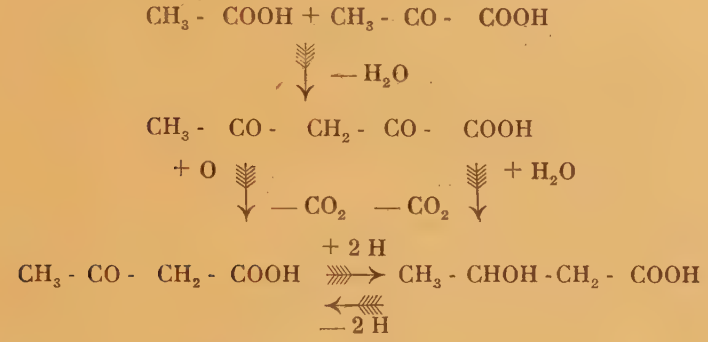
LES GLUCIDES PRÉCURSEURS POSSIBLES DES CORPS CÉTONIQUES

(Krebs)

En 1933, Koranyi et Szent-Györgyi [30] ont suggéré, pour la première fois, que l'apparition des corps cétoniques était due à un défaut du système catalytique des acides en C_4, découvert par Szent-Györgyi, et ils émirent l'hypothèse que l'acide pyruvique serait, dans ce cas, transformé en corps cétoniques au lieu d'être brûlé en CO_2 et H_2O.

Krebs et Johnson [31] ont effectivement démontré, par des expériences sur des coupes de tissu, la formation de corps cétoniques à partir de l'acide pyruvique .Voici, par exemple, une des réactions possibles faisant intervenir l'acide pyruvique et l'acide acétique. Ceux-ci se condensent en acide

acéto-pyruvique (ou $\alpha\gamma$-dicétoglutarique), qui donnera à son tour soit de l'acide acétylacétique par décarboxylation oxydative, soit de l'acide β-oxybutyrique par dismutation intramoléculaire.



Il y a là, évidemment, un fait troublant, si l'on pense que les glucides, seuls générateurs possibles de cet acide pyruvique, sont précisément considérés comme les substances anticétogènes par excellence. On ne saurait en effet donner une origine protidique (désamination de l'alanine) à cet acide pyruvique, car cela entraînerait une perte d'azote jamais constatée. Cette difficulté a fait remarquer au Pr Terroine [32] que les études du type de celles conduites par Krebs nous éclairent sur les potentialités des cellules, mais laissent encore dans une obscurité profonde le mécanisme physiologique réel des opérations intermédiaires.

L'idée nous est donc venue de tenter une vérification expérimentale de l'origine glucidique des corps cétoniques à l'échelle physiologique, pensant y trouver peut-être une lumière sur le mécanisme de l'acétonurie physiologique.

EXPÉRIENCES PERSONNELLES SUR LE ROLE POSSIBLE DES GLUCIDES DANS L'ACÉTONURIE PHYSIOLOGIQUE

Dans une première expérience, le sujet a ingéré entre 7 heures et 8 heures du matin 100 gr. de glucose dissous dans 500 cm³ d'eau. Les urines émises dans les 24 heures ont présenté les taux de corps cétoniques suivants :

Heures	Volume urine cm³	Concentration par litre en mg.		Quantité excrétée en mg.	
		Acétone	Acide β-Hydro.	Acétone	Acide β-Hydro.
10	140	2,75	20	0,38	2,80
12	330	2,0	13,50	0,66	4,45
15	200	2,75	22,50	0,55	4,50
21	120	2,0	30,0	0,24	3,60
7	575	3,0	20,0	1,72	11,50

ce qui nous donne par 24 heures, en milligrammes:

acétone + acide acétylacétique ...	3,56
Acide β-hydroxybutyrique	26,85
Corps cétoniques totaux	30,41

Dans une deuxième expérience, effectuée le surlendemain, le même sujet a ingéré la même quan-

tité de glucose, mais a reçu un centigramme de vitamine B_1 (bévitine) en injection. Les urines émises durant les 24 heures qui ont suivi renfermaient les quantités de corps cétoniques figurant dans le tableau suivant :

Heures	Volume urine cm³	Concentration par litre en mg.		Quantité excrétée en mg.	
		Acétone	Acide β-Hydro.	Acétone	Acide β-Hydro.
10	300	1,75	8,50	0,425	2,55
12	300	0,75	7,50	0,225	2,25
20	200	0,75	13,0	0,15	2,60
7	1.200	1,50	12,0	1,80	14,40

Par 24 heures, en milligrammes :

Acétone + acide acétylacétique ...	2,60
Acide β-hydroxybutyrique	21,80
Corps cétoniques totaux	24,40

On voit que l'adjonction de vitamine B_1, qui est, comme on le sait, l'agent indispensable à la dégradation de l'acide pyruvique, précurseur des corps cétoniques dans la théorie de KREBS-JOHNSON, n'a entraîné qu'une légère diminution de l'acétonurie physiologique.

L'ensemble de ces deux expériences montre que, tout au moins chez l'Homme, l'acétonurie dite phy-

siologique, n'a pas de rapport évident avec le métabolisme glucidique. Que l'on exagère celui-ci par une ingestion massive de glucose, que l'on agisse sur son cours au niveau du terme le plus caractéristique, l'acide pyruvique, l'excrétion des corps cétoniques se maintient sensiblement égale chez l'Homme sain, dans les conditions ordinaires.

CONCLUSIONS

1. De l'analyse des méthodes de dosage des corps cétoniques, il résulte que la méthode fondée sur la réaction colorée de l'acétone avec l'aldéhyde salicylique est celle qui se prête le mieux à la détermination en série des très faibles quantités d'acétone.

En ajoutant de l'alcool après la condensation de l'acétone et de l'aldéhyde en milieu aqueux, nous avons augmenté la fidélité de cette méthode sous sa forme photométrique, établissant ainsi une variante personnelle adaptée à l'objet de notre étude.

2. Nous avons vérifié que les sujets sains présentent toujours une légère excrétion de corps cétoniques. Nos résultats ne diffèrent pas sensiblement de ceux trouvés en d'autres pays, c'est-à-dire correspondant à des types d'alimentation très différents du nôtre.

Les valeurs numériques que nous avons déterminées pour l'acétonurie physiologique de neuf sujets s'échelonnent entre :

15 mg. et 68 mg. (corps cétoniques totaux par vingt-quatre heures).

3. Nous avons passé en revue les théories classiques et récentes de la cétogenèse et de la cétolyse pour y chercher l'explication de l'acétonurie physiologique.

4. Nous avons institué une expérience tendant à vérifier l'origine glucidique possible de l'acétonurie physiologique (Edson). Il ne semble pas que cette théorie puisse être retenue.

5. De l'examen des faits et des théories, ainsi que de nos expériences, il ressort que l'on ne peut encore, à l'heure actuelle, que constater l'existence de l'acétonurie physiologique. La complexité des phénomènes de la cétogenèse et de la cétolyse en rendent très difficile une interprétation unique et définitive.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. BERGELL P. — *Z. Physiol. chem.*, **33**, 310, 1901.
2. DARMSTAEDTER E. — *Z. Physiol. chem.*, **37**, 355, 1903.
3. MARSH & STRUTHERS, cité d'après VAN SLYKE in *Quantitative clinical chemistry* **2**, 624, 1932.
4. DENIGES G. — *Précis de chimie analytique* **2**, 506, 1931.
5. FABINYI R. — *Chem. Central blatt* **2**, 302, 1900.
6. GUILLAUMIN. — *J. Pharm. et chim.* **28**, 265, 1923.
7. VAN SLYKE. — *Quantitative clinical chemis.* **2**, 626, 1932.
8. HUBBARD. — *J. Biol. Chem.* **49**, 357, 1921.
9. J.-A. BEHRE & S.-R. BENEDICT. — *J. Biol. Chem.* **70**, 487, 1926.
10. URBACH. — Stufenphotometrische Absorptions-bestimmungen in der *Medizinischen chemie*, 34, 1932.
11. CZONKA. — *J. Biol. Chem.*, **27**, 209, 1916.
12. PETERS & VAN SLYKE. — *Quantitative clinical chemistry*, **1**, 405, 1931.
13. SHAFFER. — *J. Biol. Chem.*, **54**, 399, 1922.
14. HUBBARD & NOBACK. — *J. Biol. Chem.* **63**, 391, 1925.
15. J.-A. BEHRE. — *J. Biol. Chem.*, **92**, 680, 1931.
16. VALDIGUIE P. — Contribution à l'étude du métabolisme des corps cétoniques, 107, 1934.
17. TOSCANO C. — Sulla chetonuria née normali et negli ipercheto nemici. *Reforma med.*, **84**, 1781, 1932 in *Ber.* **72**, 331.
18. GUILLAUMIN. — *J. Pharm. et Chim.*, **28**, 184, 1923.
19. J.-A. BEHRE. — *J. Biol. Chem.*, **92**, 680, 1931.
20. DENIGES G. — *Précis de Chimie analytique*, **2**, 503, 1931.
21. BRENTANO, HALLMAN, BUTTS & MURRAY. — *J. Biol. Chem.*, **116**; 621, (1936).

22. JOWETT & QUASTEL J.-H. — *Biochem. J.*, **29**, 2143 (1935).

23. VERKADE. — *Bull. Soc. Chim. biol.* **18**, 989 (1936).

24. FLASCHENTRAGER & BERNHARD. — *Z. physiol. chem.* **225**, 157 (1934) et **245**, 103, (1937).

25. LEATHES & RAPER. — *The Fats.*

26. RITTENBERG & SCHŒNHEIMER. — *J. Biol. Chem.* **117**, 485, (1937).

27. SHAFFER. — *J. Biol. Chem.*, **47**, 433, (1921).

28. HENZE. — *Z. physiol. chem.* **189**, 121 ; **193**, 88 (1930) ; **195**, 248 ; **200**, 101 (1931).

29. EDSON. — *Biochem. J.* **30**, 1855 (1936).

30. KORANYI & SZENT-GYORGYI. — *Dent. med. Wochscher.* **63**, 1029 (1937).

31. KREBS & JOHNSON. — *Biochem. J.*, **31**, 645-660 et 772-779 (1937).

32. TERROINE. — *Physiologie.* 6. Lipides, p. 30. — *Actualités Scientifiques*, Hermann (1938).

TABLE DES MATIÈRES

Position du problème et Plan du travail 15

PREMIERE PARTIE. — Partie technique.

Etude des Méthodes de dosage 17

1. *Principes des méthodes* 20

2. *Méthodes volumétriques* 23

A. Dosage du bloc acétone préformée + acide acétylacétique. Méthode de Guillaumin 23

B. Dosage de l'acide β-hydroxybutyrique. Méthode de Hubbard 28

3. *Méthodes pondérales* 29

Méthode de Van Slyke 29

4. *Etude critique des méthodes volumétriques et pondérales* 34

5. *Méthodes colorimétriques* 35

A. Méthode de J.-A. Behre et S.-R. Benedict 35

B. Méthode de Urbach 39

6. *Etude comparative des méthodes colorimétriques* 46

A. Contrôles expérimentaux 46

B. Elaboration d'une technique réunissant les avantages des méthodes de Behre et de Urbach 50

DEUXIEME PARTIE

Le taux de l'Acétonurie physiologique 53

1. *Résultats antérieurs* 55
2. *Résultats personnels* 60

TROISIEME PARTIE

L'Origine de l'Acétonurie physiologique 63

Le Métabolisme intermédiaire des Acides gras, précurseurs des corps cétoniques 65

1. *La théorie classique de la β-oxydation* (Knoop). 66
2. *Théories de l'oxydation des acides gras autres que la β-oxydation* 68

A. L'oxydation alternée multiple (Jowett & Quastel) 68

B. L'oxydation en ω (Verkade) 69

C. La désaturation (Leathes) 71

3. *La cétolyse* (Ringer, Shaffer, Henze) .. 72
4. *Théorie de la compétition des substrats* (Edson). 75
5. *Les Glucides, précurseurs possibles des corps cétoniques* (Krebs) 76
6. *Expériences personnelles sur cette acétonurie d'origine glucidique* 78

Conclusions 81

Index bibliographique 83

VU :

Le Président de Thèse,

GIBERTON.

Le Doyen,

GILLOT.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Alger, le 8 Octobre 1940.

Le Recteur,

MARTINO.